

142

Circular  
TécnicaPorto Velho, RO  
Setembro, 2015

## Autores

### Rodrigo Barros Rocha

Biólogo, D.Sc. em Genética e  
Melhoramento de Plantas,  
pesquisador da Embrapa Rondônia,  
Porto Velho, RO,

### Tatiana Almeida Lopes

Bióloga, Mestrado em  
Desenvolvimento Regional,  
Universidade Federal de Rondônia  
(UNIR), Porto Velho, RO

### André Rostand Ramalho

Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em  
Fitomelhoramento, pesquisador da  
Embrapa Rondônia

### José Roberto Vieira Júnior

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em  
Fitopatologia, pesquisador da  
Embrapa Rondônia

### Cléberson de Freitas Fernandes

Farmacêutico, D.Sc. em  
Bioquímica, pesquisador da  
Embrapa Rondônia

### Alexsandro Lara Teixeira

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em  
Genética e Melhoramento de Plantas,  
pesquisador da Embrapa Rondônia



# Caracterização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade associadas ao polimorfismo do gene S em *Coffea canephora*

## Introdução

A autoincompatibilidade pode ser definida como a incapacidade de uma planta de ser fecundada pelo seu próprio pólen. A incapacidade de se autofecundar é uma importante característica do sistema reprodutivo de várias espécies vegetais alógamas, incluindo o *C. canephora*, e que evoluiu como uma forma de evitar os efeitos deletérios da endogamia (CASTRIC; VEKEMANS, 2004). Nessa espécie o impedimento à autofecundação deve-se a paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos, que impossibilita a fertilização do gametófito feminino (BERTHAUD, 1980).

Dois mecanismos de autoincompatibilidade são bem conhecidos nas plantas alógamas: a gametofítica, em que o sucesso da hibridação é determinado pela expressão do gene S (do inglês Self-incompatibility), do genoma haploide do grão do pólen, e a autoincompatibilidade esporofítica, em que a especificidade da hibridação é determinada pelo genótipo diploide da planta adulta que deu origem ao grão de pólen. O *C. canephora* apresenta autoincompatibilidade gametofítica, sendo que o impedimento da fecundação deve-se a paralisação no crescimento dos tubos polínicos que ocorre em virtude da ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico (NOWAK et al., 2011).

Na cafeicultura clonal, o cultivo de plantas clonais não compatíveis pode comprometer a produtividade da lavoura, resultado da menor eficiência da polinização. Na composição de uma cultivar clonal é possível agrupar os clones, de acordo com seus grupos de compatibilidade (FERRÃO et al., 2007). Nesse sistema, três níveis de compatibilidade são esperados: (1) polinização autoincompatível: ocorre quando os genitores apresentam formas alélicas idênticas (Ex.:  $S_1S_2 \times S_1S_2$ ); (2) compatibilidade parcial: ocorre quando os genitores possuem uma forma alélica em comum (3) compatibilidade total: ocorre quando as formas alélicas são diferentes (Ex.:  $S_1S_2 \times S_3S_4$ ) (SCHIFINO-WITTMANN; DALL AGNOL, 2002).

Segundo Borém (2005) um bom testador é aquele que permite classificar corretamente os genótipos avaliados, discriminando-os com eficiência e com um número mínimo de avaliações. A caracterização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade tem potencial para aumentar qualitativamente a eficiência das avaliações de campo, visando reduzir significativamente o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos do gene S.

Quando a interação alélica da característica em estudo é de natureza dominante, plantas homozigotas e portadoras da forma recessiva do alelo são adequadas para serem utilizadas como testadoras. Em *C. canephora*, o gene S, que governa a expressão da autoincompatibilidade, apresenta natureza co-dominante, não sendo possível naturalmente indivíduos homozigotos para esse gene. Nesse caso, as plantas testadoras devem ser aquelas cujo genótipo permite identificar as diferentes formas alélicas deste gene.

Os resultados apresentados por Berthaud e Charrier (1988) foram um dos primeiros a indicar que a autoincompatibilidade em *C. canephora* é governada pela ação de um único gene S, com pelo menos três formas alélicas ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ). Mais recentemente no centro de origem e de diversificação desta espécie, (OMOLAJA;

FAWOLE, 2004) quantificaram a interação de seis formas alélicas na expressão desta característica. O objetivo deste trabalho foi realizar hibridações direcionadas para caracterizar grupos de compatibilidade gametofítica em clones superiores de *C. canephora* identificando plantas testadoras dos grupos de compatibilidade.

## Material e métodos

### Hibridações direcionadas

Hibridações direcionadas foram realizadas em casa de vegetação na Embrapa Rondônia – Porto Velho/RO, em esquema de dialelo parcial para caracterização da genealogia para esta característica. Os clones avaliados neste trabalho foram selecionados de uma população de melhoramento contendo 158 indivíduos provenientes de diferentes polos cafeicultores do Estado de Rondônia.

Para realização das hibridações direcionadas em casa de vegetação as plantas foram cultivadas por 24 meses em vasos de 20 litros, utilizando como substrato três partes de solo para uma parte de areia e uma parte de esterco curtido. Para evitar o florescimento durante a fase desenvolvimento das plantas, os vasos foram irrigados por aspersão com molhamento diário da parte aérea das plantas, mantendo-se a umidade do solo próxima a 80% da capacidade de campo. A adubação química de cobertura foi feita considerando as características do solo segundo indicações de Marcolan et al. (2009).

Para induzir o florescimento sincronizado, a irrigação foi reduzida gradativamente no período de duas semanas até atingir, uma umidade próxima a 30% da capacidade de campo. Após duas semanas de condução em condições de baixa umidade, a indução do florescimento das plantas foi realizada com três irrigações concentradas para atingir uma capacidade de campo de 80%, sem molhamento da parte aérea.

Em cada cruzamento foram utilizados dois ramos plagiotrópicos por planta com a proteção de cinco a sete rosetas por ramo. Um dia antes da antese, os ramos plagiotrópicos com botões florais de cor branca foram protegidos utilizando sacos de papel do tipo kraft de 55 cm x 25 cm. As polinizações foram realizadas entre 7 e 10 horas da manhã, período de maior abundância e viabilidade dos grãos de pólen.

Ramos doadores e receptores foram selecionados entre aqueles que apresentavam inflorescências em antese plena. Para colocar em contato os ramos doadores e receptores foi utilizada uma abertura na extremidade do saco de papel. Após o contato entre as inflorescências, o procedimento foi finalizado com o fechamento da sacola de papel e

identificação do cruzamento. As avaliações do pegamento das hibridações foram realizadas ao longo de seis meses com a observação do desenvolvimento dos frutos.

### Interpretação dos dados

Para inferir, o agrupamento de maior probabilidade de ocorrência em função dos resultados obtidos foi utilizado o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood Estimation). Para a utilização deste método é necessário o conhecimento da função de densidade de probabilidade da variável aleatória em estudo. Considera-se que a probabilidade de ocorrência das classes genotípicas nas populações segregantes avaliadas neste estudo assumem distribuição multinomial, função do número de formas alélicas do gene S, apresentada a seguir, segundo notação de Schuster e Cruz (2004):

$$(i) \quad L(p_i / n_i) = \lambda p_1^{n_1} p_2^{n_2} p_3^{n_3} \dots p_n^{n_n};$$

$$(ii) \quad \lambda = \frac{N!}{n_1! n_2! \dots n_n!}$$

$$(iii) \quad N = \sum_{i=1}^n n_i;$$

Em que:  $N$  é o número de grupos de compatibilidade,  $n_i$  é o número de plantas de determinada classe genotípica que fazem parte do  $i$ -ésimo grupo de compatibilidade, com probabilidade  $p_i$ .

Considerando uma taxa de erro de 5%, utilizou-se o teste da razão de verossimilhança para identificar a genealogia de máxima probabilidade de ocorrência. Este teste consiste na comparação entre o estimador de máxima verossimilhança ( $\theta_A$ ) e de ocorrência da hipótese nula ( $\theta_N$ ), de que todos os indivíduos fazem parte de um mesmo grupo de compatibilidade:

$$(iv) \quad Z = \log_{10} \left[ L \left( \frac{\theta_A / x}{\theta_N / x} \right) \right]$$

## Resultados e discussão

O estudo da segregação do gene S é de natureza complexa por causa do grande número de combinações que podem ser obtidas na avaliação de um número relativamente pequeno de plantas. O número de combinações, definido como o número de maneiras diferentes que os genótipos podem se organizar nos grupos de compatibilidade, é uma relação exponencial entre o número de clones em avaliação e o número de grupos de compatibilidade.

Em virtude dessa relação exponencial, a avaliação de poucas dezenas de plantas resulta em milhões de resultados possíveis limitando a caracterização em larga escala da compatibilidade (Tabela 1). A caracterização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade tem potencial para aumentar qualitativamente a eficiência das avaliações de campo reduzindo significativamente o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos do gene S pela realização de cruzamentos teste.

**Tabela 1.** Número de maneiras possíveis com que  $n$  indivíduos ( $1 \leq n \leq 30$ ) podem ser organizados em  $j$  grupos de compatibilidade ( $3 \leq j \leq 6$ ).

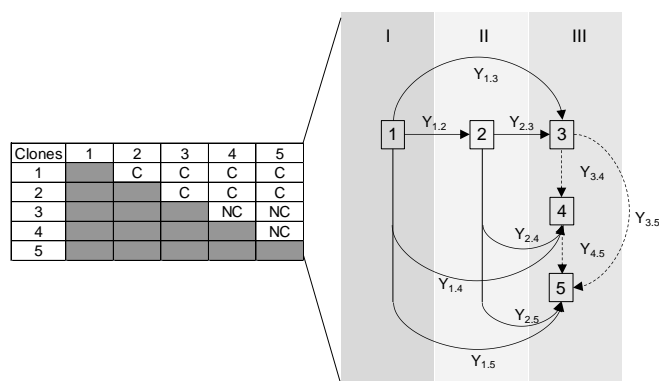
Genótipos	Grupos				
	2	3	4	5z	6
1	2	3	4	5	6
2	4	9	16	25	36
3	8	27	64	125	216
4	16	81	256	625	1296
5	32	243	1024	3125	7776
6	64	729	4096	15625	46656
7	128	2187	16384	78125	279936
8	256	6561	65536	390625	1679616
9	512	19683	262144	1953125	10077696
10	1024	59049	1048576	9765625	60466176
....	....	....	....	....	....
....	....	....	....	....	....
....	....	....	....	....	....
27	$1.3 \cdot 10^8$	$7.6 \cdot 10^{12}$	$1.8 \cdot 10^{16}$	$7.5 \cdot 10^{18}$	$1.0 \cdot 10^{21}$
28	$2.7 \cdot 10^8$	$2.3 \cdot 10^{13}$	$7.2 \cdot 10^{16}$	$3.7 \cdot 10^{19}$	$6.1 \cdot 10^{21}$
29	$5.4 \cdot 10^8$	$6.9 \cdot 10^{13}$	$2.9 \cdot 10^{17}$	$1.9 \cdot 10^{20}$	$3.7 \cdot 10^{22}$
30	$1.1 \cdot 10^9$	$2.1 \cdot 10^{14}$	$1.2 \cdot 10^{18}$	$9.3 \cdot 10^{20}$	$2.2 \cdot 10^{23}$

De maneira geral observou-se uma predominância de cruzamentos compatíveis (70%). No estudo do padrão de herança é importante considerar que cada procedimento de hibridação realizado tem uma probabilidade de erro, por causa das condições de manipulação ou de ambiente. Dois tipos de erros estão associados ao teste de hipóteses. O erro tipo I, denominado de falso negativo, que ocorre quando não se rejeita a hipótese  $H_0$  de que todos os indivíduos fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade. E o erro tipo II, denominado de falso positivo, que ocorre quando em virtude da contaminação de plantas não compatíveis produzem frutos e rejeita-se a hipótese verdadeira.

Segundo Charrier e Eskes, (2004) a contaminação é uma das fontes de erro mais importantes na hibridação direcionada de *C. canephora*. Cuidados com a ação de insetos polinizadores devem ser tomados considerando a proteção das inflorescências e aplicação de inseticidas sistêmicos, quando em casa de vegetação para proteção contra pequenos insetos polinizadores

(*Trypys* spp.). A abertura não sincronizada das flores também pode ser um fator impeditivo para a realização de cruzamentos controlados.

Um grupo de compatibilidade é formado por indivíduos que possuem o mesmo genótipo para o gene S, e por este motivo, não são compatíveis entre si. Os resultados dos cruzamentos indicam a ocorrência de três grupos de compatibilidade, identificados por algarismos romanos (Figura 1). A estimativa da razão de verossimilhança, que pondera a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade ( $H_0$ ) e da hipótese alternativa ( $H_a$ ) em função dos dados obtidos, foi igual a 9 ( $Z=9$ ). Essa estimativa indica que o agrupamento dos clones nos grupos de compatibilidade é  $10^9$  vezes mais provável do que a hipótese  $H_0$ , de que todos os genótipos pertencem a somente um grupo de compatibilidade (Figura 1). Segundo Schuster e Cruz (2004) estimativas iguais ou superiores a três, que indica que a hipótese  $H_0$  é 1000 vezes mais provável que a hipótese alternativa, devem ser consideradas.



**Figura 1.** A. Resultados das hibridações direcionadas realizadas entre cinco clones de *C. canephora*, em que: C – cruzamento compatível, NC – cruzamento não compatível. B. Esquema mais provável de distribuição dos genótipos em seus respectivos grupos de compatibilidade indicados pelos algarismos romanos I, II e III.

Em comparação com os resultados de Omolaja e Fawole (2004), que observaram a ocorrência de cinco diferentes formas alélicas no centro de origem dessa espécie, avaliações em populações brasileiras têm indicado a existência de apenas três alelos (FERRÃO et al., 2007). A possibilidade de identificar novos alelos do gene S em germoplasma brasileiro abre a possibilidade para uma redução expressiva no percentual de grãos moca pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis.

A partir da caracterização dos três grupos de compatibilidade é possível selecionar plantas de cada um deles para serem utilizados como testadoras, uma vez que cada grupo de compatibilidade está diretamente associado a uma diferente forma alélica do gene S (Tabela 2). Ainda

que poucos trabalhos tenham mensurado o efeito prejudicial da autoincompatibilidade em café Conilon, o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moca e diminuir a produtividade de grãos por causa do isolamento de plantas não compatíveis.

**Tabela 2.** Identificação das plantas testadoras em função dos grupos de compatibilidade encontrados (I, II e III), associados às diferentes formas alélicas do gene *S*.

Grupo	Forma alélica	Plantas testadoras		
I	S <sub>1</sub> S <sub>2</sub>	1	-	-
II	S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>	2	-	-
III	S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	3	4	5

A caracterização das plantas testadoras irá aumentar qualitativamente a eficiência das avaliações de campo reduzindo o número de hibridações necessárias permitindo a realização de cruzamentos teste.

## Conclusões

A caracterização dos sistemas de autoincompatibilidade é importante para a evolução dos programas de melhoramento genético. O agrupamento de maior probabilidade de ocorrência mostrada é 10<sup>9</sup> vezes mais provável do que a hipótese H<sub>0</sub> de que todos os genótipos pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade. A caracterização das plantas testadoras permite aumentar a eficiência das avaliações de campo reduzindo o número de hibridações necessárias pela realização de cruzamentos teste.

## Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio ao projeto “Desenvolvimento de método para caracterização da autoincompatibilidade gametofítica do cafeeiro Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner)”, e ao Consórcio Pesquisa Café financiado pelo Fundo de Defesa da Economia Cafeteira – FUNCAFÉ, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## Referências

- BERTHAUD, J. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 24, n. 1, p. 167-174, 1980.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee: Agronomy**. London: Elsevier, 1988. v. 4, p. 1-42.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 969 p.
- CASTRIC, V.; VEKEMANS, X. Invited Review: Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 10, p. 2873-2889, 2004.
- CHARRIER, A.; ESKES, A. B. Botany and Genetics of Coffee. In: WINTGENS, J. N. (Ed.). **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Darmstadt: WILEY-VCH, 2004. p. 25-56.
- FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Cultivares de Café Conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. (Ed.). **Café Conilon**. Espírito Santo: Incaper, 2007. p. 203-225.
- MARCOLAN, A. L.; RAMALHO, A. R.; MENDES, A. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; FERNANDES, C. F.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA, J. R.; OLIVEIRA, S. J. M.; FERNANDES, S. R.; VENEZIANO, W. **Cultivo dos cafeeiros conilon e Robusta para Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 61 p.
- NOWAK, M. D.; DAVIS, A. P.; ANTHONY, F.; YODER, A. D. Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea* (Rubiaceae). **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, 2011.
- OMOLAJA, S. S.; FAWOLE, I. Determination of the number of self-incompatibility alleles (SIA) in *Coffea canephora* and the role of pollen-stylar protein in the expression of SIA. INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore, India. **Anais...** Montpellier, France: ASIC, 2005. p. 684-687.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 568 p.

### Circular Técnica, 142

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PÁTRIA EDUCADORA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Rondônia**  
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127,  
CEP 76815-800, Porto Velho, RO.  
Fone: (69)3901-2510, 3225-9384/9387  
Telefax: (69)3222-0409  
[www.embrapa.br/rondonia](http://www.embrapa.br/rondonia)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição  
1ª impressão (2015): 100 exemplares

### Comitê de Publicações

**Presidente:** *Alexsandro Lara Teixeira*  
**Secretária:** *Marly de Souza Medeiros*  
**Membros:** *Marília Locatelli*  
*Rodrigo Barros Rocha*  
*José Nilton Medeiros Costa*  
*Ana Karina Dias Salman*  
*Luiz Francisco Machado Pfeifer*  
*Fábio da Silva Barbieri*  
*Wilma Inês de França Araújo*  
*Daniela Maciel Pinto*

### Expediente

**Normalização:** *Daniela Maciel*  
**Revisão de texto:** *Wilma Inês de França Araújo*  
**Editoração eletrônica:** *Marly de Souza Medeiros*